

# 表皮生长因子受体在绵羊卵巢中的表达

马 红

(黑龙江农业科学院畜牧研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 收集成年绵羊卵巢标本, 采用免疫组织化学的方法检测 EGFR 蛋白在绵羊卵巢组织中的表达情况。研究结果表明, 在绵羊卵巢中 EGFR 蛋白的表达具有时空特异性, 它集中分布在发育各阶段的卵泡颗粒细胞中, 并随卵泡的发育程度表现出表达量的差异。本研究说明 EGFR 与其配体 EGF 结合具有刺激颗粒细胞增殖分化、促进卵丘扩展和刺激卵母细胞成熟的功能。

**关键词:** 表皮生长因子受体; 绵羊; 卵母细胞; 卵巢

中图分类号: S821; Q813      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)02-0078-02

## Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in the Sheep Ovary

MA Hong

(Animal Husbandry Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Adult sheep ovarian specimens were collected and EGFR protein expression in sheep ovarian organizations was detected by the Immunohistochemistry detection methods. In sheep ovarian expression of EGFR protein specificity of time and space, it mainly in the developmental stage Granulosa cell, and with the development of follicle demonstrated expression of differences. The study found EGFR and EGF could stimulate distribution follicle cell divide and stimulate oocyte maturation.

**Key words:** epidermal growth factor receptor; sheep; oocyte; ovarian

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种存在于细胞表面的多功能跨膜蛋白分子。其结构分为三个区域: 膜外与配体识别并结合区域; 位于细胞膜中间的跨膜区以及具有酪氨酸激酶活性的细胞质内区域。EGFR 的配体——表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种多肽类生长因子, 该因子在人和动物各种组织器官生长发育过程中是一种重要的调节因子。EGF 通过旁分泌、自分泌机制, 与细胞膜上的 EGFR 结合, 使 EGFR 本身的激酶发生自身磷酸化, 使细胞内三磷酸肌醇和二酰基甘油增多, 作为第二信使引起细胞内游离  $Ca^{2+}$  增多, 激活蛋白激酶 C, 使细胞增殖、迁移和分化等发生改变<sup>[1]</sup>。在刺激上皮细胞生长, 参与卵子、精子在输卵管的成熟及受精卵的早期发育等过程中发挥作用。

目前有研究资料表明, 卵巢中 EGFR 通过与 EGF 的结合, 可调节卵巢的多种功能活动, 如促进

卵泡发育、卵母细胞成熟、其他细胞增殖、分化和类固醇的产生等<sup>[2]</sup>。但未见关于 EGFR 蛋白在卵巢中各个部分的具体的定位和表达对比研究, 另外, 在卵母细胞发育的不同时期 EGFR 蛋白表达量的变化情况也未见具体报道。本研究旨在通过系统研究 EGFR 蛋白在卵巢中的分布情况, 及其表达量与卵母细胞程度的关系来系统阐述表皮生长因子对绵羊生殖的作用, 为促进绵羊繁殖育种和体细胞克隆相关研究提供理论支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 卵巢的收集

从屠宰场收集刚屠宰的新鲜绵羊卵巢, 其年龄、遗传背景、妊娠与否不详。采集的卵巢置于 20~38℃加有 100 IU·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 μg·mL<sup>-1</sup>链霉素的生理盐水的保温瓶中, 2 h 内运至实验室。随后用含青、链霉素的等温生理盐水冲洗卵巢 2~3 次至无血水, 备用。

#### 1.2 免疫组织化学

保持采集卵巢的正常形态, Bouin S 固定液迅速固定, 50%、75%、80%、95%、100%梯度酒精脱水, 二甲苯透明后石蜡包埋切片, 切片厚度为 7 μm, 备用。

收稿日期: 2007-10-09  
作者简介: 马红(1974-), 女, 黑龙江省人, 博士, 助理研究员, 从事胚胎生物学研究。Tel: 13101583001, 86657928 E-mail: ma-hong\_ok@163.com.

切片经二甲苯和 100%、95%、80%、75%、50% 梯度乙醇脱蜡至水; 含 10% 马血清封闭, 37℃ 孵育 1 h; 用第一抗体(兔抗人 EGFR, 1 : 100)4℃ 孵育 16 h; 1×PBS 洗 3 次; 加入 1 : 200 生物素标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 25℃ 孵育 30 min; 1×PBS 洗 3 次; 加入碱性磷酸酶标记的链亲合素三抗 1 : 200, 25℃ 孵育 30 min; 1×PBS 洗 3 次; 用美国 Vector Laboratory 公司提供的 Vector Red 碱性磷酸酶底物试剂盒 25℃ 显色 20 min, 阳性结合部位显红色; 苏木精对染 2 min; 中性树脂封片; 显微镜下观察及拍照。另外, 用兔 IgG 代替兔抗人 EGFR 抗体作为阴性对照。

1.3 结果判定

根据切片中绵羊卵巢组织中免疫组化着色强弱, 分为以下几级: 阴性、弱阳性、中等强度、强阳性和特别强。

2 结果与分析

2.1 EGFR 蛋白对卵母细胞的成熟具有重要的作用

卵母细胞在体外可自发地完成第一极体的排出, 但这些体外成熟的卵子缺少使雄性染色体形成雄原核的能力<sup>[3]</sup>。EGF 可以加快卵母细胞进入 MII 期, 使卵母细胞成熟过程中蛋白质合成增加, 这些说明 EGF 可能直接通过与 EGFR 结合作用于卵母细胞。

试验显示, EGFR 蛋白在卵巢皮质的免疫染色集中出现在各级卵泡周围, 而在其他区域如结缔组织和黄体中, 未观察到阳性免疫染色位点。EGFR 蛋白在成熟卵泡周围, 距离卵母细胞越近的颗粒细胞中的表达量越大。实验结果间接说明了, EGF 对促进绵羊卵母细胞的成熟具有重要的作用。

2.2 EGFR 与其配体(EGF)结合具有促进颗粒细胞增殖与分化的功能

已有研究表明, EGFR 与其配体(EGF)结合, 激活 ras—MAPK 途径刺激细胞的增殖与分化, 加速卵丘细胞之间缝隙连接的消失, 并能够有效克服细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。在本试验中, EGFR 蛋白在各级卵泡周围颗粒细胞中的免疫染色强度, 随卵泡发育而迅速增强。而卵泡从初级卵母细胞到成熟卵泡的发育过程中, 首先伴随的是周围颗粒细胞的增殖与分化。

本试验结果表明, EGFR 蛋白在各级卵泡周围颗粒细胞的免疫染色强度随卵泡的不断成熟而迅速增强, 在原始卵泡周围只有很弱的阳性反应, 当卵泡发育到初级卵泡后, 免疫反应强度迅速增强, 当达到成熟卵泡阶段后, EGFR 蛋白免疫染色强度达到最大。这说明, 在绵羊卵巢中各级卵泡周围, EGFR 蛋白的大量出现, 是与颗粒细胞的增殖、分化卵泡腔的形成相适应的, EGFR 与其配体(EGF)结合具有促进颗粒细胞增殖与分化, 刺激卵丘扩展, 加快卵母细胞成熟过程的功能。

2.3 EGFR 与其配体(EGF)结合具有促进产生雌性激素的功能

雌性动物的卵巢具有产生雌性生殖激素的功能, 在生长发育的卵泡颗粒细胞和内膜细胞上, EGFR 等与细胞增殖有关因子的受体, 它们通过与相关配体的结合可产生芳香化酶, 还可将内膜产生并弥散转运至颗粒细胞的雄激素(主要为雄烯二酮)转变为雌激素<sup>[5]</sup>。

在试验中, EGFR 蛋白表达特异性位点, 主要存在于次级和成熟卵泡的卵泡内膜颗粒细胞以及卵丘颗粒细胞上, 卵丘颗粒细胞的 EGFR 的染色强度大于卵泡内膜上的颗粒细胞, 而卵泡内膜的 EGFR 的染色强度大于卵泡外膜的染色强度。透明带无免疫染色; 在各级卵母细胞的胞质中有隐约可见的染色阳性反应。卵巢髓质、卵泡膜和颗粒细胞 EGFR 的大量表达也说明, 在成年雌性绵羊卵巢可以促进产生大量的雌性激素, 对于绵羊生殖功能有重要的调节作用。

3 结论

结果表明, 在绵羊卵巢中 EGFR 蛋白的表达具有时空特异性, 它集中分布在发育各阶段的卵泡颗粒细胞中, 并随卵泡的发育程度表现出表达量的差异。证明 EGFR 与其配体 EGF 结合具有刺激颗粒细胞增殖分化和促进卵母细胞成熟的功能, 另外也可以促进产生大量的雌性激素调节绵羊的生殖功能。

通过对 EGFR 的研究将深入了解 EGFR 对卵泡发育的调节机理, 从而可以人为调节卵泡发育, 对提高卵母细胞体外成熟率, 推进绵羊体外受精和克隆的研究提供理论基础。同时, 对控制绵羊超数排卵, 治疗卵巢疾病具有实践和应用前景。

参考文献:

[ 1 ] Wiley L M, Adamson E D. Epidermal Growth Factor Receptor Function in Early Mammalian Development[ J ]. BioEssays, 1995, 17: 839-846.

[ 2 ] Chen B, Xie H, Sekar C, et al. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: Phospholipase C activity is required but mitogenactivated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement[ J ]. J. Cell Biol., 1994, 127: 847-857.

[ 3 ] Lorenzo P L, Liu I K, Illera J C, et al. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway[ J ]. J Physiol Biochem, 2001, 57(1): 15-22.

[ 4 ] Wang Y, Ge W. Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells[ J ]. Biol Reprod, 2004, 71(3): 749-760.

[ 5 ] Garnett K, Wang J, Roy S K. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone[ J ]. Biol Reprod, 2002, 67(5): 1593-1604.